

동시 UV-Vis 측정을 사용한 RNA 순도의 비교 평가

Agilent Cary 3500 UV-Vis를 사용하여 RNA $A_{260/280}$ 에 미치는 pH 및 이온 강도의 영향 평가



저자

Aveline Neo
Agilent Technologies, Inc.

개요

핵산 순도를 평가하는 표준 방법은 260nm(A_{260}) 및 280nm(A_{280}) 파장에서 분광 광도법으로 흡광도를 측정하는 것입니다. 본 응용 자료에 따르면, 리보핵산(RNA) 시료 완충액의 pH와 이온 강도의 변화는 $A_{260/280}$ 비율에 영향을 미치는 것으로 입증되었습니다. 다른 결과에서는 알칼리성 용액에서 RNA 측정 시 단백질 오염 검출 성능이 상당히 향상되었습니다. 이 연구에서는 Agilent Cary 3500 멀티셀 Peltier UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 여러 실험을 동시에 수행하고 Cary 3500 UV-Vis에 내장된 방정식 소프트웨어 기능을 사용하여 RNA 순도를 평가하는 이점을 알아봅니다.

소개

RNA의 무결성과 순도 평가는 후속 실험과 응용에서 RNA 품질을 보장하는 데 필수적입니다. 손상되거나 오염된 RNA는 유전자 발현의 신뢰도를 떨어뜨릴 수 있으며, 이러한 유형의 분석에서도 출된 결론에 부정적 영향을 미칠 가능성이 있습니다.¹ 또한, 캡슐화된 RNA는 의약품으로 사용될 수 있기 때문에 RNA 품질은 의약품 제조 분야에서 중요한 품질 속성입니다.

RNA 정량과 순도 평가에 분광 광도계를 사용하는 것은 이미 잘 알려진 방식입니다. 260nm와 280nm에서 시료의 흡광도를 측정하여 결정되는 $A_{260/280}$ 비율은 핵산 시료의 순도를 평가하는 데 사용됩니다. 260nm에서의 흡광도는 주로 핵산의 존재를 나타내는 반면, 280nm에서의 흡광도는 오염 단백질의 존재를 나타냅니다. 따라서 순수한 RNA 시료의 $A_{260/280}$ 비율은 2.00이고, 단백질 시료의 비율은 0.57입니다.²

$A_{260/280}$ 비율이 유용한 파라미터이기는 하지만, Wilfinger 등은 분광 광도계 평가에 사용되는 용액의 pH와 농도가 이 비율에 상당한 영향을 미칠 수 있다고 보고했습니다.³ 핵산 제제의 정량적 평가도 pH와 농도의 영향을 받습니다.

이 연구에서는 Cary 3500 멀티셀 Peltier UV-Vis 분광 광도계 (그림 1)를 사용하여 Wilfinger 등이 보고한 것과 유사한 실험을 수행했습니다. Cary 3500 멀티셀 Peltier UV-Vis는 측정 효율성을 높이기 위해 8개의 큐벳 위치를 포함한 혁신적인 시스템입니다. Cary 3500을 사용하면 여러 시료의 UV 흡광도를 동시에 측정할 수 있어 원치 않는 가변성을 제거하고 결과에 대한 신뢰도를 높일 수 있습니다. Agilent Cary UV Workstation 소프트웨어의 내장된 방정식 기능은 UV 스캔을 기반으로 $A_{260/280}$ 비율을 자동으로 계산하여 분석 처리 속도를 향상시킵니다.

Cary 3500을 사용하여 RNA 시료 용액의 pH와 이온 강도가 $A_{260/280}$ 비율에 미치는 영향도 조사했습니다. RNA의 단백질 오염 식별에 pH와 이온 강도가 미치는 영향 또한 조사했습니다. 두 가지 완충액과 물에서 RNA의 UV 흡광도 스캔을 비교하는 작업도 수행했습니다.



그림 1. Agilent Cary 3500 멀티셀 Peltier UV-Vis 분광 광도계.

실험

기기

이 연구에서는 Agilent Cary 3500 멀티셀 Peltier UV-Vis 분광 광도계를 사용했습니다. 데이터 수집은 Cary 3500 Multizone 소프트웨어 애드온을 포함한 Agilent Cary UV Workstation 소프트웨어(버전 1.4.256)에서 표 1에 나타난 파라미터를 사용하여 수행했습니다. 이 소프트웨어에는 50개 이상의 방정식 기능이 내장되어 있습니다. 10mm의 UV 경로 길이와 70 μ L 충전량을 갖춘 초소형 직사각형 셀(부품 번호 5062-2496)이 사용되었습니다. 각 셀에 50 μ L의 시료량을 적용하였습니다. Cary 3500은 폭이 1.5mm 미만인 균일하고 정확한 평행 빔과 고정형 셀 홀더의 영구적인 광학 정렬 덕분에 이렇게 작은 시료량까지 측정할 수 있습니다.

표 1. Agilent Cary 3500 멀티셀 Peltier UV-Vis 분광 광도계 파라미터.

파라미터	값
X 모드	nm
Y 모드	흡광도
수집 모드	스캔
스캔 범위 시작	400nm
스캔 범위 중지	220nm
평균화 시간	0.020초
데이터 간격	1.00nm
스캔 속도	3,000nm/min
스펙트럼 대역폭	2.00nm
검출기 모듈	멀티셀 Peltier UV-Vis

시약 및 재료

HeLa 세포주는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, Virginia, USA)에서 구입했습니다. Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)은 Thermo Fisher Scientific(Waltham, Massachusetts, USA)에서 구입했습니다.

Agilent Absolutely RNA microprep 키트(부품 번호 400805)를 사용하여 HeLa 세포에서 RNA를 추출했습니다.

소 혈청 알부민(BSA), 인산이나트륨(Na_2HPO_4), 트리스-염산염 (tris-HCl) 및 염화나트륨(NaCl)은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입했습니다. EDTA 용액은 Merck(Darmstadt, Germany)에서 구입했습니다.

0.22 μm membrane Point-of-Use 카트리지가 장착된 Milli-Q Integral 시스템(Millipak, Merck-Millipore, Billerica, MA, USA)을 사용하여 신선한 초순수를 얻었습니다.

HeLa 세포 펠릿에서 RNA 추출

HeLa 세포를 DMEM 세포 배양 배지에서 100,000개 세포로 배양시켰습니다. 세포를 플레이트에서 긁어 배지로 넣은 후 15mL Falcon 튜브로 옮겼습니다. Absolutely RNA Microprep 키트 프로토콜을 사용하여 RNA를 추출하기 전에 세포 부유물을 1,200rpm으로 5분 동안 원심분리하여 세포를 침전시켰습니다.

RNA ScreenTape(부품 번호 5067-5576), RNA ScreenTape 시료 완충액(부품 번호 5067-5577) 및 RNA ScreenTape 리더(부품 번호 5067-5578)를 갖춘 Agilent 4200 TapeStation 시스템(부품 번호 G2991AA)을 사용하여 추출한 RNA의 품질을 검사했습니다. RNA를 -80°C에서 동결시키고 분석 직전에 해동했습니다.

HeLa 세포에서 RNA 추출 및 순도 평가 워크플로

그림 2A에서 볼 수 있듯이, HeLa 세포를 내부적으로 배양했고, Absolutely RNA microprep 키트 프로토콜을 사용하여 총 RNA를 추출했습니다. 추출된 RNA는 DNA 및 RNA 시료의 품질 관리를 위한 자동화 전기영동 솔루션인 4200 TapeStation 시스템을 사용하여 RNA 품질을 확인했습니다. RNA ScreenTape 장치를 사용하여 총 RNA를 분석하면 리보솜 피크와 잠재적인 분해 산물을 식별하여 총 RNA 품질을 평가할 수 있습니다. RNA 무결성 수치 등가(RIN^e, RNA Integrity Number equivalent)로 알려진 개별 RNA 품질 점수가 1-10점 척도에 따라 각 시료에 할당되며, 1은 고도로 분해된 RNA를 나타내고 10은 매우 온전한 RNA를 나타냅니다. 이 연구에 사용된 추출 RNA의 RIN^e 값은 10이었습니다(그림 2B). 그런 다음 Cary 3500 UV-Vis로 추출된 RNA 흡광도를 측정하여 RNA 순도를 평가했습니다.

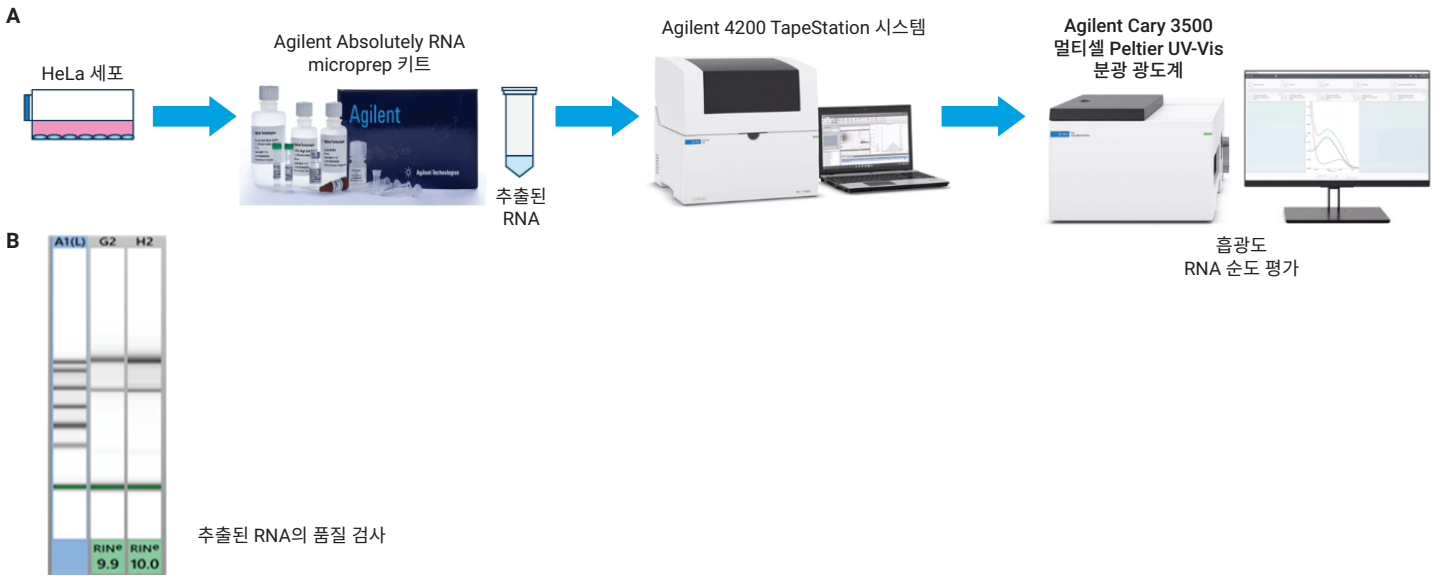


그림 2. (A) RNA를 추출하기 위한 애질런트 소모품, 품질과 순도를 평가하기 위한 Agilent 4200 TapeStation 시스템과 Agilent Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계의 사용을 보여주는 워크플로 다이어그램입니다. (B) HeLa 세포에서 추출한 RNA를 4200 TapeStation에서 분석한 RIN^e 값은 10이었습니다.

실험

본 연구에서는 다음의 세 가지 실험을 수행했습니다.

1. pH와 Na₂HPO₄ 농도가 RNA의 A_{260/280} 비율과 흡광도에 미치는 영향 연구

Na₂HPO₄를 초순수로 희석하여 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5 및 10mM 농도의 시료를 얻었으며, 초순수를 실험에 대조군으로 포함시켰습니다. 모든 pH 측정은 Mettler Toledo(Greifensee, Switzerland)의 SevenCompact pH 측정기 S220을 사용하여 수행했습니다. RNA는 각각의 Na₂HPO₄ 용액 농도로 0.0062µg/µL까지 희석시켰습니다.

2. 용해된 BSA 단백질이 존재할 때 RNA의 A_{260/280} 비율에 미치는 pH 및 이온 강도의 영향 연구

Na₂HPO₄는 0.01, 0.1, 1 및 10mM의 농도로 희석시켰으며 실험에 물을 대조군으로 포함시켰습니다. RNA를 각각의 완충액에 최종 농도 0.0062µg/µL로 용해시켰습니다. 단백질이 첨가된 RNA(최종 농도 0.0062µg/µL의 RNA와 최종 농도 0.1µg/µL의 BSA를 모두 포함)를 각각의 완충액에 용해시켰습니다. BSA도 각각의 완충액에 0.1µg/µL의 농도로 준비했습니다.

3. 1mM Na₂HPO₄, TNE 완충액 및 물에서 HeLa RNA의 UV 흡광도 스캔 분석

pH 7.4에서 10mM tris, 1mM EDTA 및 0.2mM NaCl을 포함한 TNE 완충액을 준비했습니다. RNA를 TNE 완충액, 1mM Na₂HPO₄ 및 물에 최종 농도 0.0062µg/µL로 희석시켰습니다.

흡광도 측정

Cary 3500 멀티셀 Peltier UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 모든 실험 시료의 흡광도 값을 측정했습니다. 각 실험에서 분광 광도계의 영점을 맞추기 위해 적절한 바탕시료 용액을 사용했고 분석 중에는 베이스라인 보정을 사용했습니다.

Cary 3500 멀티셀 Peltier UV-Vis는 여러 시료를 동시에 측정할 수 있어 분광 광도 측정의 효율성을 높이고 일관된 측정 조건을 유지합니다. 4개 구역에서 8개의 셀 위치를 사용할 수 있으므로, 이 기기로 1개 구역(큐벳 8개), 2개 구역(각 구역에 큐벳 4개), 또는 4개 구역(각 구역에 큐벳 2개)에서 시료를 분석할 수 있습니다. 각 구역에는 자체 참조 채널이 있습니다.

단백질 오염 연구에는 Cary 3500 UV-Vis의 2구역 기능을 사용했습니다. 이 구성에서 한 번의 측정으로 두 개의 완충액을 연구할 수 있었습니다(그림 3). 그림 4에서 볼 수 있듯이, 이 기기의 4구역 기능은 3가지 용액(TNE 완충액, 1mM Na₂HPO₄ 또는 물)에서 RNA를 동시에 측정하는 데 사용되었습니다. 측정을 완료할 때마다, Cary UV Workstation 소프트웨어의 내장된 방정식 기능이 A_{260/280} 비율을 자동으로 계산하여 보고합니다(그림 5). Cary 3500의 이러한 기능은 단일 큐벳 시스템을 사용하는 경우에 비해 UV 흡광도 스캔 처리량을 증가시킵니다.

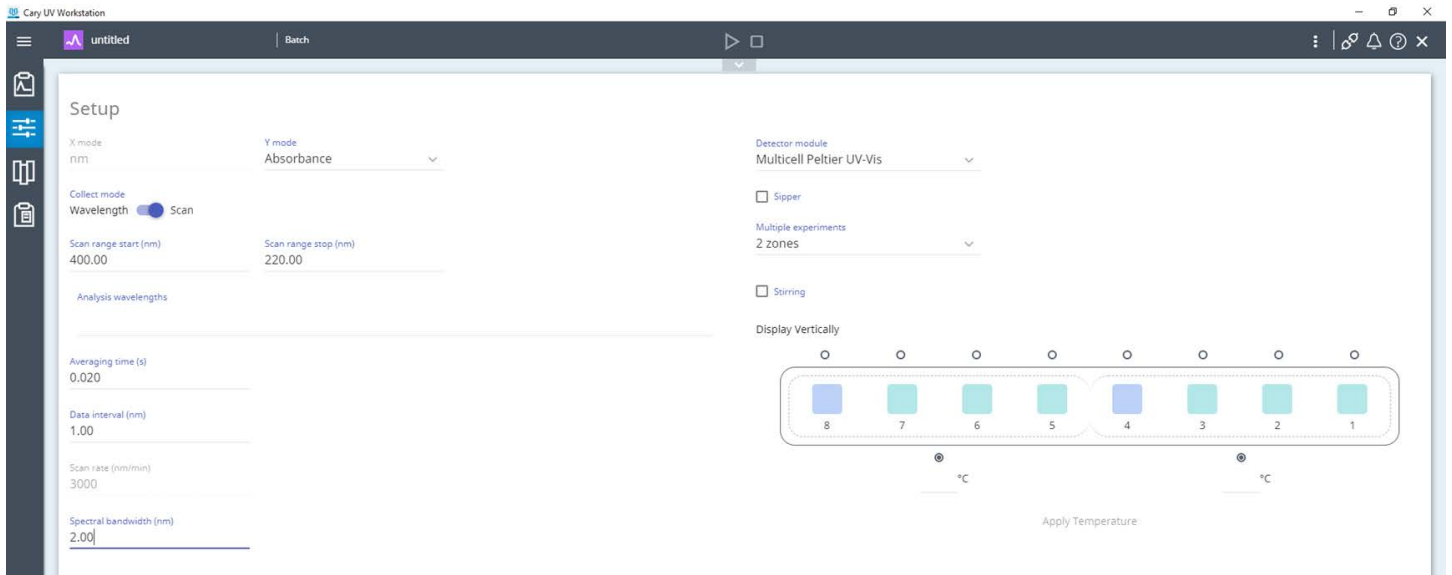


그림 3. Agilent Cary 3500 멀티셀 Peltier UV-Vis의 "2구역" 다중 실험 기능. 녹색과 보라색 위치는 각각 시료와 참조 용액을 나타냅니다.

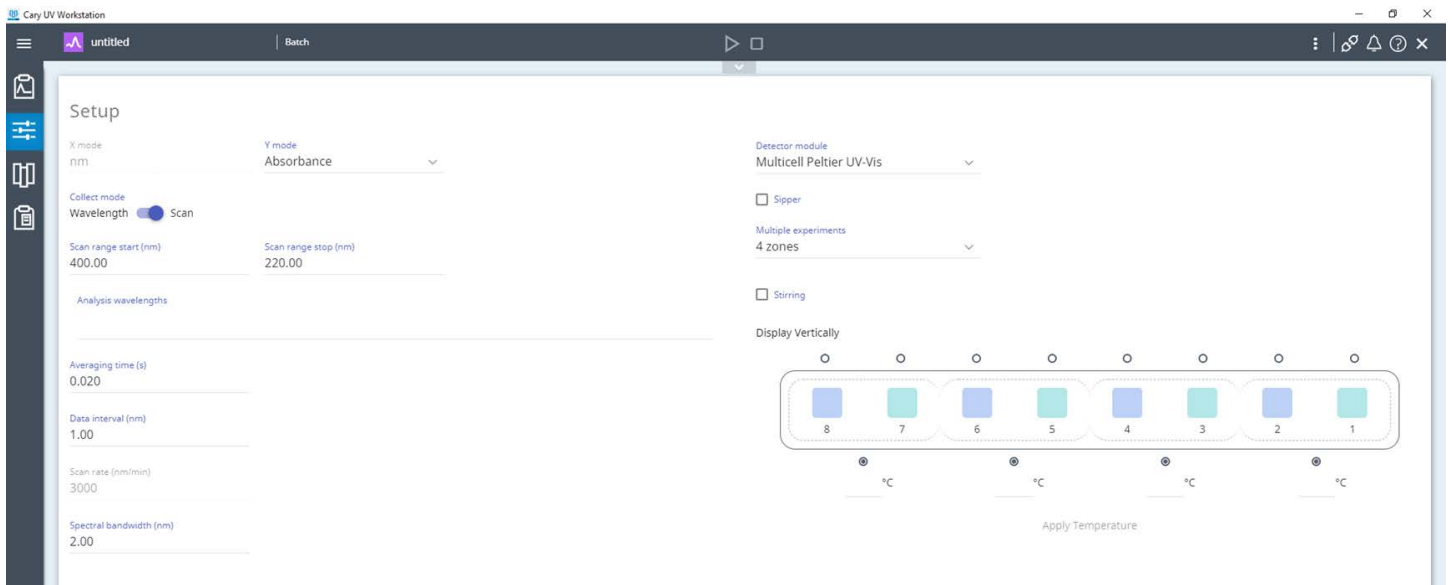


그림 4. Agilent Cary 3500 멀티셀 Peltier UV-Vis의 "4구역" 다중 실험 기능. 녹색과 보라색 위치는 각각 시료와 참조 용액을 나타냅니다.

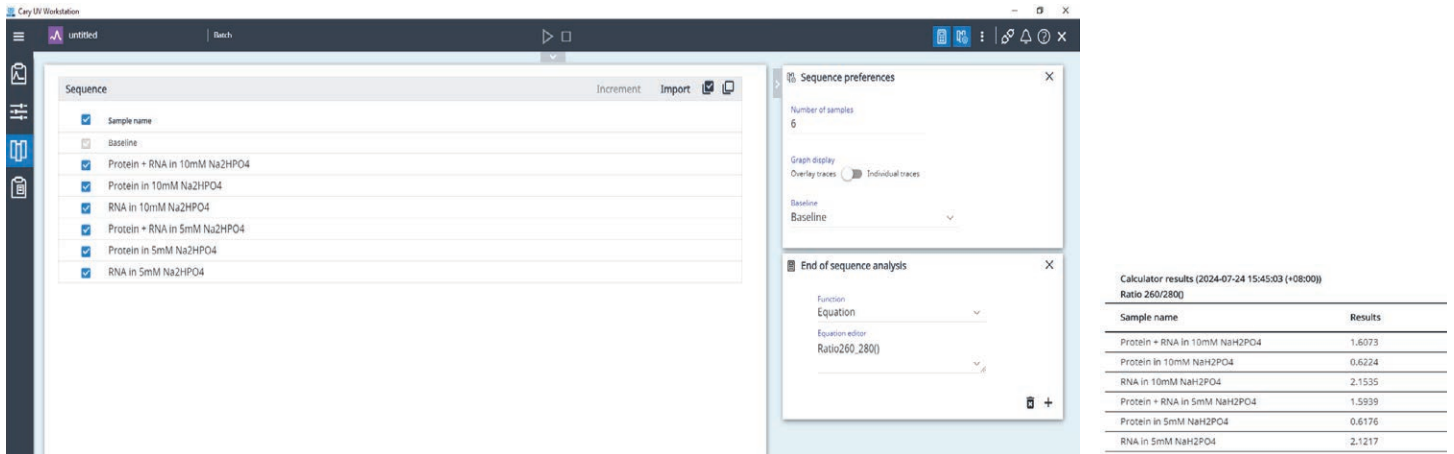


그림 5. Agilent Cary UV Workstation 소프트웨어에 내장된 방정식 기능을 사용하여 $A_{260/280}$ 비율을 자동으로 계산하고 보고합니다.

결과 및 토의

pH와 Na_2HPO_4 농도가 RNA의 $A_{260/280}$ 비율과 흡광도에 미치는 영향

pH와 Na_2HPO_4 농도가 RNA의 $A_{260/280}$ 비율과 흡광도에 미치는 영향을 평가하기 위해 농도가 0.1-10mM인 Na_2HPO_4 용액 11개를 완충제로 사용했습니다.³ $A_{260/280}$ 비율의 증가는 pH와 Na_2HPO_4 농도의 증가에 정비례했습니다. pH 값 7.2-8.6과 Na_2HPO_4 농도 0.02-1mM 사이에서 급격한 증가가 나타났습니다(그림 6A).

그림 6B는 Na_2HPO_4 농도 또는 pH가 증가함에 따라 A_{260} 과 A_{280} 값이 감소함을 보여줍니다. 각 Na_2HPO_4 농도에 대한 흡광도의 감소 백분율은 물에 대한 상대적인 값으로 측정되었습니다. A_{280} 의 감소 백분율 곡선의 기울기는 그림 6C의 각 점선에서 볼 수 있듯이 A_{260} 곡선의 기울기보다 더 가파릅니다. 이러한 결과는 $A_{260/280}$ 비율이 280nm에서 흡광도의 pH 또는 이온 강도의 감소에 따라 증가함을 나타냅니다.

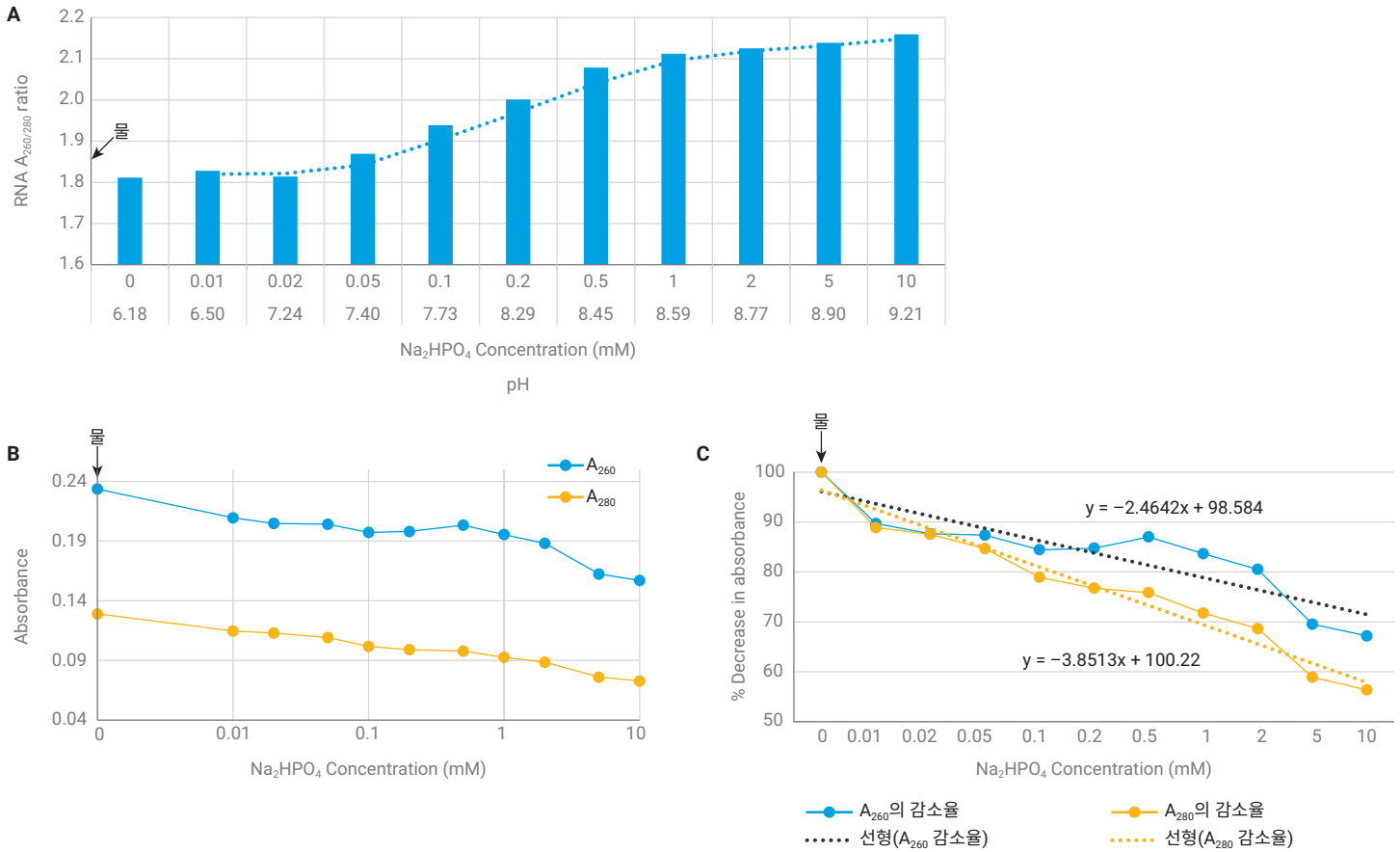


그림 6. pH와 Na₂HPO₄ 농도가 (A) A_{260/280} 비율과 (B) 흡광도에 미치는 영향. (C) 260nm 및 280nm에서 흡광도의 변화율.

11개의 Na₂HPO₄ 용액 각각에 대해 3회 측정했습니다. Cary 3500의 2구역 다중 실험 기능을 사용하여 두 농도의 Na₂HPO₄ 시료를 3회 측정했습니다. 이 방법을 사용하여 60분 내에 11개 농도의 Na₂HPO₄를 모두 분석할 수 있었습니다(33개 시료와 11개 참조 용액을 6회 측정). 이 멀티셀 접근 방식은 단일 큐벳 시스템에 비해 분석 처리량을 6배나 증가시켰습니다.

RNA에서 단백질 검출에 미치는 pH 및 이온 강도의 영향

단백질 오염 검출에 미치는 완충액의 pH 및 이온 강도의 영향을 조사하기 위해³, BSA 단백질이 존재하는 11개 Na₂HPO₄ 용액에서 RNA 흡광도를 평가했습니다.

그림 7A는 단백질이 첨가된 경우와 첨가되지 않은 경우에 Na₂HPO₄의 흡광도 특성을 보여줍니다. 10mM Na₂HPO₄의 RNA는 A_{260/280} 비율이 2.15였지만, 단백질이 존재하는 경우 A_{260/280} 비율은 1.61로 떨어졌습니다. 이 그림은 단백질이 RNA의 흡광도 특성을 어떻게 변화시키는지 명확하게 보여줍니다.

RNA와 RNA 포함 단백질 간 A_{260/280} 비율이 물에서는 19.1% 감소한 반면, 1.0mM Na₂HPO₄에서는 26.6% 감소했습니다(그림 7B). 이 연구 결과는 알칼리성 조건에서 단백질 오염이 더 쉽게 검출된다는 것을 보여줍니다.

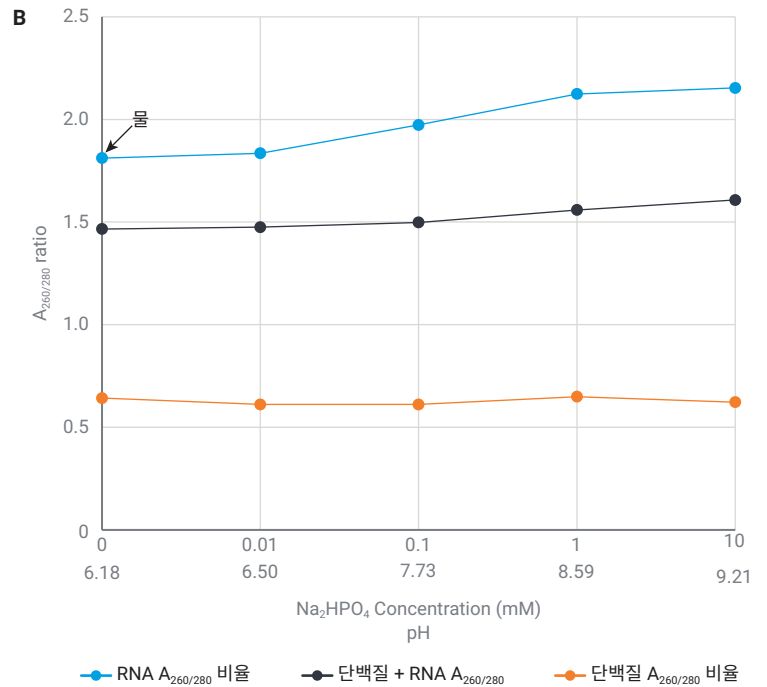
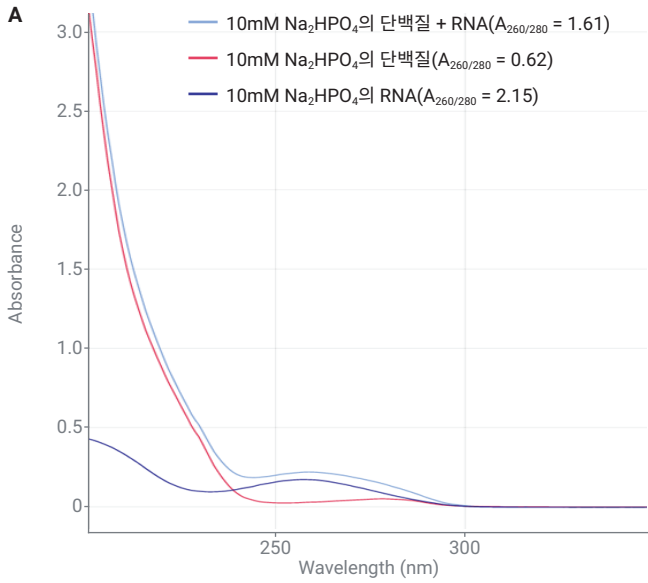


그림 7. 단백질이 있거나 없는 상태에서 pH와 이온 강도가 RNA $A_{260/280}$ 비율에 미치는 영향. (A) 10mM Na_2HPO_4 에서 RNA, 단백질 및 단백질이 첨가된 RNA 시료의 흡광도 특성. (B) 0.01-10mM Na_2HPO_4 에서 RNA, 단백질 및 단백질이 첨가된 RNA의 $A_{260/280}$ 비율 플롯.

다양한 완충액에서 HeLa 세포의 총 RNA 측정

다양한 완충액이 RNA의 UV 흡광도 스펙트럼에 미치는 영향을 조사하기 위해 물(pH 6.18), 1mM Na_2HPO_4 (pH 8.59) 및 완충액 (TNE)에서 분석을 수행했습니다. TNE 완충액은 핵산 분광 광도 분석에 자주 권장되기 때문에 이 실험에 포함시켰습니다.³

그림 8에서 볼 수 있는 바와 같이, 두 완충액(1mM Na_2HPO_4 와 TNE)에서 RNA의 UV 흡광도 스펙트럼은 비슷한 반면, 물에서 RNA의 UV 특성은 더 높은 파장으로 이동했습니다. 이 결과는 완충액에 용해된 RNA 시료가 물에 용해된 RNA와 다른 UV 흡광도 트레이스를 보임을 나타냅니다. 알칼리성 완충 용액은 순수한 물에 용해된 RNA 시료보다 RNA 순도를 더 잘 추정할 수 있습니다. 따라서 추출한 RNA를 용해하는 데 알칼리성 완충 용액을 사용하는 것이 좋습니다.

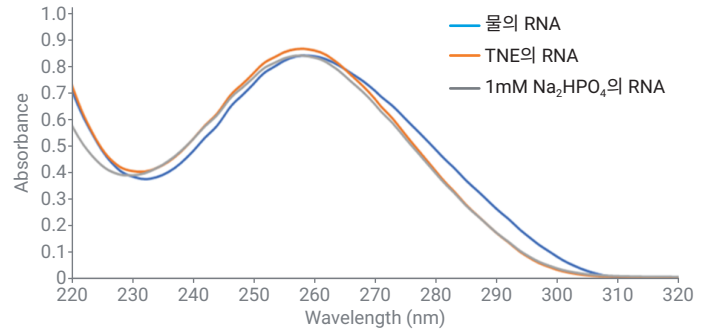


그림 8. 물, TNE 완충액 및 1mM Na_2HPO_4 에서 분석한 HeLa RNA의 UV 흡광도 특성. 이 결과는 Wilfinger 등³이 보고한 결과와 일치하여 연구 전반에 걸쳐 결과의 일관성을 보여줍니다.

결론

이 응용 자료에서는 Agilent Cary 3500 멀티셀 Peltier UV-Vis 분광 광도계를 사용하여 $A_{260/280}$ 비율에 따라 RNA 순도를 평가하는 효과적인 방법을 보여주었습니다. Cary 3500을 사용하면 여러 실험 조건을 동시에 테스트할 수 있어 원치 않는 실험 변수를 피할 수 있습니다.

데이터에 따르면 RNA 용액의 pH와 이온 강도가 $A_{260/280}$ 비율에 상당한 영향을 미치고 RNA 시료의 단백질 오염은 알칼리성 조건에서 더 잘 예측할 수 있다는 사실이 밝혀졌습니다. Cary 3500 소프트웨어에 내장된 방정식 기능을 사용하여 $A_{260/280}$ 을 자동으로 계산하고 보고할 수 있었습니다. 이러한 기능을 통해 다양한 완충 조건에서 RNA 시료를 정확하고 효율적으로 평가할 수 있었습니다. 이 소프트웨어는 규제된 환경에서 사용할 수 있는 Agilent OpenLab 소프트웨어 제품군과 호환됩니다. OpenLab은 FDA 21 CFR Part 11, EU Annex 11 및 기타 국가의 유사한 규제를 준수해야 하는 실험실을 위해 데이터를 안전하게 수집 및 저장하는 기술적 제어 기능을 제공합니다.

애질런트는 RNA 품질을 평가하는 데 필요한 소모품(예: Absolutely RNA Microprep 키트), 기기(예: 4200 TapeStation 시스템 및 Cary 3500 UV-Vis 분광 광도계) 및 워크플로 솔루션을 제공합니다.

참고 자료

1. Vermeulen, J.; De Preter, K.; Lefever, S.; Nuytens, J.; De Vloed, F.; Derveaux, S.; Hellemans, J.; Speleman, F.; Vandesompele, J. Measurable Impact of RNA Quality on Gene Expression Results from Quantitative PCR. *Nucleic Acids Research*, 39(9), **2011**, e63-e63.
2. Brescia, P. Microvolume Purity Assessment of Nucleic Acids Using A_{260}/A_{280} Ratio and Spectral Scanning. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-2538EN, **2021**.
3. Wilfinger, W. W.; Mackey, K.; Chomczynski, P. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *Biotechniques*, 22(3), **1997**, 474-481.

www.agilent.com

RA45590.3881944444

연구용으로만 사용하십시오. 진단 용도로는 사용하지 않습니다.

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

© Agilent Technologies, Inc. 2024
2024년 11월 14일, 한국에서 인쇄
5994-7892KO
PR7001-3461

한국애질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
DF타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com